



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12Q 1/60, G01N 33/536, 33/92</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/59068</p> <p>(43) 国際公開日 1998年12月30日 (30.12.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/02795</p> <p>(22) 国際出願日 1998年6月22日 (22.06.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/169281 1997年6月25日 (25.06.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 国際試薬株式会社 (INTERNATIONAL REAGENT'S CORPORATION)[JP/JP] 〒651-0083 兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号 Hyogo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 岸 浩司(KISHI, Koji)[JP/JP] 角山 功(KAKUYAMA, Tsutomu)[JP/JP] 白波瀬泰史(SHIRAHASE, Yasushi)[JP/JP] 渡津吉史(WATAZU, Yoshifumi)[JP/JP] 〒651-2241 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2号 国際試薬株式会社 研究開発センター内 Hyogo, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 高島 一(TAKASHIMA, Hajime) 〒541-0046 大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号 (湯木ビル) Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: METHOD FOR ASSAYING BIOLOGICAL SPECIMENS FOR SUBSTANCES CONTAINED IN THE COMPONENTS THEREOF AND REAGENT TO BE USED IN THIS METHOD</p> <p>(54) 発明の名称 生体試料成分中の物質の分析方法及びこれに用いられる試薬</p> <p>(57) Abstract A method for assaying biological specimens for substances contained in the components of each specimen by the use of one or more calixarenes; and a reagent comprising one or more calixarenes. The method is characterized by utilizing the property of calixarenes of forming complexes with the components of biological specimens, and makes it possible to assay biological specimens for substances contained in the components of each specimen, for example, for cholesterol contained in high-density lipoprotein (HDL), without preliminary separation from the other components of the specimen. The method can be conducted by easy and simple operations and lessen measurement errors or problems caused by man, and permits continuous measurement with general-purpose automatic analyzers and multichannel measurement together with other test items.</p>		

## (57)要約

一種または二種以上のカリクスアレン類を用いて生体試料成分中の物質を分析する方法、および、一種または二種以上のカリクスアレン類を含有する試薬。

カリクスアレン類が生体試料成分と複合体を形成することを特徴とし、生体試料成分中の物質、例えば高比重リポ蛋白質（HDL）中のコレステロールを、あらかじめ他の生体試料成分と分離することなく分析することができる。操作が簡便であり、測定誤差や人為的要因での問題を低減させることができる。汎用型の自動分析装置を用いた連続的な測定が可能となり、他の検査項目とマルチチャンネル化して測定することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	JP	日本	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KR	韓国	SD	スーダン		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン				

## 明 細 書

生体試料成分中の物質の分析方法及びこれに用いられる試薬

## 技術分野

本発明は、臨床診断の分野における生体試料成分中の物質を分析する方法及びこれに用いられる試薬に関する。具体的には、例えば高比重リポ蛋白質（HDL）中のコレステロールを分析する方法及びこれに用いられる試薬に関する。

## 背景技術

リポ蛋白質は、古くから超遠心操作によって、高比重リポ蛋白質（HDL、比重1.063～1.21）、低比重リポ蛋白質（LDL、比重1.019～1.063）、超低比重リポ蛋白質（VLDL、比重1.006～1.019）、カイロミクロン（CM、比重<1.006）に分画されている。この分画操作は、超遠心機を必要とする上に、遠心を数日に亘って行わなければならない、多検体を処理することはできなかった。

これに代わり、ポリエチレングリコールまたはデキストラン硫酸等のポリアニオンにマグネシウムやカルシウム等の二価カチオンを共存させたり、あるいはリンタングステン酸に二価カチオンを共存させた分画剤なる溶液と血清とを混和させることによって、LDL、VLDL、CMを沈澱させ、遠心後の上清に残るHDLのみを分画する方法が主流となっていた。この方法では、臨床検査の分野で広く普及している自動分析装置を用いることができた。すなわち、酵素法による総コレステロールの測定が自動分析装置によって確立しているので、この確立した測定法を応用して、分画したHDL中のコレステロール濃度を求めることができた。

しかしながら、この方法も低速とは言え遠心操作が必要であり、分画剤と血清とを混和させるときの人為的な定量誤差や検体の取り違いなどが問題となっていた。その上、自動分析装置で他の一般的な生化学項目を同時には測定できなかった。臨床検査は迅速対応が求められており、このことから検査時間の短縮が課題となっていた。

一方、臨床的には動脈硬化のリスクファクターであるLDL中のコレステロール値を重視する報告〔総コレステロールの基準値と設定根拠、動脈硬化、24(6), 260(1996)〕もある。現在LDL中のコレステロール値は総コレステロール(T-CHO)、中性脂肪(TG)及びHDL中のコレステロールの測定結果から経験的なファクターを代入して求められる。その式〔Friedewald WT, et al, Clin. Chem., 18, 499-502(1972)〕を以下に示す。

LDL中のコレステロール値 = (T-CHO値) - (HDL中のコレステロール値) - (TG値) / 5

この方法では、測定する三項目が全て正確に測定されなければ成立しない。また、TG値が400 mg/dlを越えたり、LDL中のコレステロール濃度が100 mg/dl以下になると計算値がLDL中のコレステロール濃度を反映しなくなると言われている〔Warnick GR, et al, Clin. Chem., 36(1), 15-19(1990)、McNamara JR, et al, Clin. Chem., 36(1), 36-42(1990)〕。したがって、この方法では、肝心な異常値が求められない。他に、電気泳動でリポ蛋白を分離し蛋白量を測定する方法やHPLCによるリポ蛋白別コレステロールの測定方法もあるが、いずれも検体処理能力に欠ける方法であり、高価な装置も必要となる。

近年、HDL中のコレステロール測定に関して前述した問題を解決するため、全自動のHDL中のコレステロールを測定するキットが開発され普及しつつある。特許第2600065号公報、特開平8-201393号公報及び特開平8-131195号公報に記載の技術は分画剤を併用するが、分画剤に含まれる二価カチオンとして用いられる金属が自動分析装置で一般的に使用される洗剤により不溶性の沈澱物を形成し、それが廃液機構で蓄積することによって、自動分析装置の故障の原因となっている。更に反応液中に不溶性の凝集物を形成し、測定結果に影響を与える濁りが生じて測定誤差の原因となっているばかりか、凝集物により反応セルが汚染されて、同時に測定している他の生化学項目の測定結果に少なからず影響を与えている。

普及しているほとんどの自動分析装置では、10分で反応を完了する場合が多

い。このとき反応中に濁度変化があっては測定値の正確性に問題がある。その他、反応液が濁ると再現性が低下するという問題も加わる。それ故、測定する検体に制限が加わり、幅広い測定波長と多種多様な患者検体に対応することができない。例えば、340 nm付近（UV領域）では凝集物による濁りの現象により、吸光度が2以上、あるいは3以上となって分析機の許容範囲をしばしば越えてしまう欠点がある。

二価カチオンを用いることのない特開平9-96637号公報の技術は、リポ蛋白と凝集する抗血清を含ませる方法であるが、これも難溶性の抗原抗体凝集物を形成するので、反応セルが汚染される。したがって、同時に測定している他の生化学項目の測定結果に少なからず影響を与える。また、反応液中の濁りが強度となるので、特にUV領域によるHDL中のコレステロール測定に対しても前述と同じ原因で正確な測定が不可能である。高波長域でも濁りの影響で測定値の正確性に欠ける。

また、このような濁りを最終的に消去する技術が特開平6-242110号公報に開示されているが、この方法によると最低でも3～4段階の試薬分注操作が必要となり、一般的に普及している生化学項目用の自動分析機は最大2段階のものが主流であるので、この方法を自動分析機に応用できないことが多い。

一方、LDL中のコレステロールの測定に至っては、現在も計算による方法を採らざるを得ない状況である。

本発明の目的は、汎用の自動分析機を用いて遠心操作による分離をせずに、HDLやLDL中のコレステロール等の生体試料成分中の物質を分析する方法及びこれに用いられる試薬を提供することにある。

#### 発明の開示

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、金属などの包接（Rogers, R. D. et al. J. Radioanal. Nucl. Chem., 208, 153-161(1996)）のために開発されたカリクスアレン類が、分離操作を必要とせず、例えばリポ蛋白質中の成分の分別定量に有効であることを見い出した。

すなわち、本発明は、一種または二種以上のカリクスアレン類が生体試料成分と複合体を形成することを特徴とするカリクスアレン類を含有する試薬、カリクスアレン類を含有する生体試料成分中の物質の分析用試薬、および、カリクスアレン類を用いて生体試料成分中の物質を分析する方法に関する。

生体試料成分とは、血清中や血漿中などに含まれる特定の成分であり、例えばHDL、LDL、VLDL、CM及びレムナント様リポ蛋白質などのリポ蛋白質が挙げられる。また生体試料成分中の物質とは、生体試料成分中に含まれる分析の目的となる物質であり、例えば、生体試料成分がリポ蛋白質のときは、コレステロール、中性脂質やリン脂質などが挙げられる。

カリクスアレン類は、フェノールを基本骨格とし、フェノールの4～8分子をメチレン基で環状に重合させた環状オリゴマーである。カリクスアレン類としては、カリクス(4)アレン〔Calix(4)arene〕、カリクス(6)アレン、カリクス(8)アレン、硫酸カリクス(4)アレン、硫酸カリクス(6)アレン、硫酸カリクス(8)アレン、酢酸カリクス(4)アレン、酢酸カリクス(6)アレン、酢酸カリクス(8)アレン、カルボキシカリクス(4)アレン、カルボキシカリクス(6)アレン、カルボキシカリクス(8)アレン、カリクス(4)アレンアミン、カリクス(6)アレンアミン、カリクス(8)アレンアミンなどが挙げられる。本発明においては、これらカリクスアレン類から選ばれる一種または二種以上を用いることができるが、使用に際しては特に制限されない。製品化に成功している硫酸カリクスアレンが水溶性に優れ取扱いが容易である。このカリクスアレン類をコレステロール測定に応用する場合、コレステロールを酵素的に測定する条件下に、反応液中に0.05～20mmol/l、好ましくは0.1～5mmol/lとなるように添加すればよい。

本発明における分析とは、生体試料成分中の物質を測定することであり、定性または定量することである。

カリクスアレン類が生体試料成分複合体を形成するとは、カリクスアレン類と生体試料成分が結合していれば、特に結合方法は制限されないが、例えば、イオ

ン結合や配位結合などがあげられる。

リポ蛋白質は、コレステロールを含む脂質成分とアポ蛋白質とが結合することにより内部に脂質、外部に蛋白質が存在するものであり、生体中で可溶化している。カリクスアレン類は、リポ蛋白質表面とのイオン結合により、主にLDLやVLDLと複合体を形成し、リポ蛋白質中の成分（例えばコレステロールや中性脂質）が遊離することを抑制する。したがって、複合体を形成することは、複合体が形成された生体試料成分に含まれる物質の酵素反応を阻害することになり、目的とする生体試料成分中の物質を酵素反応により測定することができる。例えば、LDLやVLDL中のコレステロールや中性脂質の酵素反応を阻害させ、HDL中のコレステロールや中性脂質を定量することができる。

反応液中のpH条件については、分析する物質に依存し、例えばHDL中のコレステロールを測定する場合には、総コレステロール測定を完成する条件であればよいが、通常pH6.0～9.0の範囲である。

本発明においては、カリクスアレン類の濃度を変化させることにより、分析の対象とする生体試料成分を選択できる。例えば、0.7mM未満ではLDL、0.7～5mMの範囲ではHDL、および10mM付近ではVLDLを選択し、それぞれの生体試料成分中の物質を測定することができる。ここで示した濃度範囲は、pH等の測定条件によりそれぞれ至適濃度が変化するので一義的ではなく、各々の測定条件により実験的に定められるものである。

このように、カリクスアレン類の濃度を変化させることにより、測定対象とする物質が含まれる生体試料成分を選択できることは、体外診断薬の分野に応用するのに有用である。例えば、従来の方法では、HDL中のコレステロール測定には、測定対象物質（コレステロール）のみの測定に限定した方法が用いられており、その方法は同じHDL中のコレステロールとは異なる物質、例えばHDL中の中性脂質の測定には適用できなかった。また同じコレステロールの測定においても、HDL中のコレステロールのみに有効であり、他のリポ蛋白質、例えばLDL中のコレステロールには適用できなかった。本発明は同じ生体試料成分中の

異なる物質の分析に適用できる特徴がある。例えばHDL中のコレステロールのみならず、HDL中の中性脂質やリン脂質の分析にも適用できる。したがって、HDL、LDL、VLDL、CM及びレムナント様リポ蛋白質のリポ蛋白質画分に含まれるコレステロール、中性脂質及びリン脂質を測定対象とすることができる。

本発明の試薬は、生体試料成分中の物質の測定に適した公知の測定用試薬に、カリクスアレン類を最終濃度が所望の濃度となるように配合させた試薬キットとして、または、所望の濃度となるべく調整されたカリクスアレン類含有試薬と公知の測定用試薬を組み合わせた試薬キットとして通常提供される。提供される際の試薬の形態は、乾燥状、液状など特に限定されるものではない。試薬キット中には、酵素の活性化剤などが配合されていてもよい。また試薬キットが、例えば第一反应用試薬と第二反应用試薬との組合せのように、反応液中に添加する時期が異なる複数の種類の試薬を組み合わせたものであってもよい。

本発明の分析方法においては、市販の各種測定用試薬に緩衝液を加えて調製するに際して、カリクスアレン類を最終濃度が所望の濃度となるように添加する態様も包含される。

本発明の試薬は、カリクスアレン類を含有し、その他の成分として、目的とする生体試料成分中の物質と反応する酵素等の試薬を含有するように適宜調製される。例えば、HDLやLDL中のコレステロール値は、総コレステロールを測定する方法により測定される。このときに、リポプロテインリパーゼ（LIP）、コレステロールエステラーゼ（CE）、コレステロール脱水素酵素（CDH、例えばニコチンアミドアデニンジヌクレオチド依存性コレステロール脱水素酵素、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドフォスフェート依存性コレステロール脱水素酵素等）及びコレステロールオキシダーゼ（CO）からなる群から選ばれる一種または二種以上の酵素が用いられる。さらに、コレステロールを測定する反応を完成させるための条件下で添加する活性化剤、安定化剤、補酵素、過酸化水素定量用のペルオキシダーゼ（PO）及び発色剤が適宜選択される。



また、CDHを用いる場合、この酵素の可逆反応を阻止する目的で、ヒドラジン類を添加する技術〔特開平5-176797号公報〕が先に報告されているが、本発明においてもヒドラジン類を添加した状況下で分析することができる。また、酵素を化学修飾して酵素に選択性を持たせる技術〔特許第2600065号公報〕があり、本発明においてもかかる酵素を用いることができるが、本発明においてはそのような酵素を使用しなくても十分な選択性を得ることができる。

CDHを用いる際の補酵素としては、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型(NAD)、Thio-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型(t-NAD)、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸酸化型(NADP)、Thio-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸酸化型(t-NADP)等が挙げられ、これらからなる群から選ばれる一種または二種以上の補酵素が用いられる。コレステロールの存在によって、これら補酵素は、それぞれの還元型、すなわちNADH、t-NADH、NADPH、t-NADPHに変換される。

総コレステロールの測定において酵素の活性化剤として用いられるコール酸類や界面活性剤は、コレステロールを酵素で測定する条件下において適宜選択し、実験的に濃度を調整して用いることができる。例えば、HDL中のコレステロールを測定する場合、第一反応でHDL以外のリポ蛋白質にカリクスアレン類を添加して、複合体を形成させて安定化させ、第二反応で酵素等を添加して、HDL中のコレステロール濃度を測定すればよい。

LDL中のコレステロールを測定する場合は、先に述べた条件を組み合わせ、第一反応でLDLと複合体を形成させ安定化させる一方で、HDL及びVLDL中のコレステロールを予め反応させて消去し、残ったLDL中のコレステロールを第二反応にて測定する。

第一反応時においてリポ蛋白質と複合体を形成するカリクスアレン類は、その種類の組み合わせや濃度を調整すればよい。また、コレステロールの測定には、①CDH、②CODとLIP及び③CEの三種を組み合わせた酵素反応を用いれ

ばよい。第二反応にてLDLの複合体を分解させる界面活性剤、コール酸類、酵素等を添加し、第一反応で未反応のLDL中のコレステロールを測定すれば、第一反応におけるコレステロール濃度との差引でLDL中のコレステロール濃度が求められる。このときLDLを分解させるために添加する化合物は、酵素的にコレステロールを測定することを妨害しなければ何等制限されない。

VLDL中のコレステロールを測定する場合は、先に述べた条件を組み合わせ、第一反応でVLDLと複合体を形成させ安定化させる一方で、HDL及びLDL中のコレステロールを予め測定する。第一反応時においてリポ蛋白質と複合体を形成するカリクスアレン類は、その種類の組合せと濃度を適宜調整すればよい。第二反応にてVLDLの複合体を分解させる界面活性剤、コール酸類、酵素等を添加し、第一反応で未反応のVLDL中のコレステロールを測定すれば、第一反応におけるコレステロール濃度との差引でVLDL中のコレステロール濃度が求められる。このときVLDLを分解させるために添加する化合物は、酵素的にコレステロールを測定することを妨害しなければ何等制限されない。

この複合体を形成し、酵素反応にて目的物質を測定する方法は、選択的にリポ蛋白質中のコレステロールを測定するのみでなく、目的とする物質に対する酵素を適宜変更することにより、リポ蛋白別に中性脂肪またはリン脂質などの測定にも応用ができる。

以下、本発明をより詳細に説明するために、HDL及びLDL中のコレステロールの測定例について記すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 〔実施例1〕

以下の試薬1, 2を調製し、HDL-コレステロールを測定した。

#### 試薬1の調製

緩衝液	pH 6.5
硫酸カリクス(6)アレン	1.0 mmol/l
二塩化ヒドラジニウム	100 mmol/l
$\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型 [NAD]	

5. 0 mmol / l

## 試薬 2 の調製

緩衝液

pH 8. 5

コレステロール脱水素酵素

20. 0 U / ml

コレステロールエステラーゼ

6. 0 U / ml

検体は、一般人の血清 25 例を用いた。測定は、自動分析装置（日立 7170 型自動分析装置）で実施した。操作法は、先ず検体 5  $\mu$ l に試薬 1 を 180  $\mu$ l 加え 37℃ で 5 分間恒温し、この時点で主波長 340 nm 及び副波長 570 nm にて吸光度 1 を測定した。

更に、試薬 2 を 60  $\mu$ l 加え 37℃ で 5 分間恒温し、この時点で主波長 340 nm 及び副波長 570 nm にて吸光度 2 を測定した。吸光度 1 と吸光度 2 との差を求めて、既知 HDL-コレステロール濃度のコントロールを標準液として検体の値を換算した。対照法としてポリエチレングリコール（PG）法を用いた。PG 法は国際試薬社製 PG ポールを使用した。また、遠心後の上清のコレステロール濃度は、国際試薬社製 T-CHO 試薬・A を用いて求めた。その結果を表 1 に示した。

対照法との相関性は、相関係数 0. 993、回帰式  $Y = 0. 989 X + 1. 18$  であり良好な相関性を得た。なお、回帰式中の Y は実施例 1 による値（単位：mg / dl）であり、X は PG 法による値（単位：mg / dl）である。

表1: 測定結果 (単位: mg/dl)

検体No.	本 法	対 照 法
1	39.2	42.2
2	45.5	43.2
3	57.7	56.4
4	47.2	46.2
5	75.4	74.4
6	41.9	39.9
7	37.4	36.6
8	94.3	88.5
9	50.1	49.3
10	85.9	91.7
11	95.1	92.6
12	39.1	39.5
13	29.7	28.0
14	61.8	62.1
15	52.5	51.0
16	63.6	61.9
17	69.6	71.0
18	81.4	79.9
19	27.0	25.0
20	50.0	50.5
21	40.4	39.5
22	74.9	77.0
23	69.2	67.2
24	52.8	54.1
25	68.8	68.6

## 〔実施例2〕

以下の試薬1, 2を調製し、HDL-コレステロールを測定した。

## 試薬1の調製

緩衝液

pH 6.5

N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンナトリウム

1.0 mmol/l

硫酸カリクス(6)アレン

1.0 mmol/l

ペルオキシダーゼ

5.0 U/l

## 試薬2の調製

緩衝液

pH 7.0

コレステロール脱水素酵素

10.0 U/ml

コレステロールエステラーゼ 6.0 U/ml

4-アミノアンチピリン 10.0 U/ml

検体は、一般人の血清20例を用いた。測定は、自動分析装置（日立7170型自動分析装置）で実施した。操作法は、先ず検体3  $\mu$ lに試薬1を180  $\mu$ l加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長600nm及び副波長700nmにて吸光度1を測定した。

更に、試薬2を60  $\mu$ l加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長600nm及び副波長700nmにて吸光度2を測定した。吸光度1と吸光度2との差を求めて、既知HDL-コレステロール濃度のコントロールを標準液として検体の値を算出した。対照法としてポリエチレングリコール（PG）法を用いた。対照法の操作は、実施例1に従った。測定結果を表2に示した。

対照法との相関性は、相関係数0.986、回帰式 $Y = 0.879X + 6.03$ であり良好な相関性を得た。なお、回帰式中のYは実施例2による値（単位：mg/dl）であり、XはPG法による値（単位：mg/dl）である。

表2： 測定結果（単位：mg/dl）

検体No	本 法	対 照 法
1	49.2	50.9
2	43.9	45.4
3	51.9	58.0
4	51.0	51.9
5	66.9	71.4
6	70.4	71.1
7	47.6	43.3
8	28.1	25.0
9	34.8	32.4
10	69.7	73.3
11	41.7	41.5
12	60.8	62.0
13	102.1	104.3
14	42.5	47.2
15	47.1	45.9
16	63.6	67.3
17	45.6	42.8
18	42.3	37.6
19	52.5	54.9
20	37.0	30.1

## 〔実施例 3〕

以下の試薬 1, 2 を調製し、LDL-コレステロールを測定した。

## 試薬 1 の調製

緩衝液	pH 7. 5
硫酸カリクス (6) アレン	0. 8 mmol / ℓ
二塩化ヒドラジニウム	100 mmol / ℓ
β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型 [NAD]	5. 0 mmol / ℓ
コレステロール脱水素酵素	10. 0 U / ml
コレステロールエステラーゼ	4. 0 U / ml

## 試薬 2 の調製

緩衝液	pH 7. 5
コレステロールエステラーゼ	3. 0 U / ml

検体は、一般人の血清 24 例を用い、フリーデワルド式による換算既知の LDL-コレステロール濃度のコントロールを標準液として検体の値を算出した。測定は、自動分析装置（日立 7170 型自動分析装置）で実施した。操作法は、先ず検体 3 μℓ に試薬 1 を 210 μℓ 加え、37℃ で 5 分間恒温し、この時点で主波長 340 nm 及び副波長 570 nm にて吸光度 1 を測定した。

更に、試薬 2 を 70 μℓ 加え、37℃ で 5 分間恒温し、この時点で主波長 340 nm 及び副波長 570 nm にて吸光度 2 を測定した。吸光度 1 と吸光度 2 との差を求め、既知 LDL-コレステロール濃度のコントロールを標準液として検体の値（単位：mg/dℓ）を算出した。

対照法として国際試薬社製 T-CHO 試薬・KL「コクサイ」、TG 試薬・A 及び PG ポール法を用い、フリーデワルドの式により LDL-コレステロール濃度を求めた。その結果を表 3 に示した。

対照法との相関性は、相関係数 0. 982、回帰式  $Y = 1. 008 X + 5. 98$  であり良好な相関性を得た。なお、回帰式中の Y は実施例 3 による値（単位：

mg/dl) であり、Xは対照法による値 (単位: mg/dl) である。

表3: 測定結果 (単位: mg/dl)

検体No.	本 法	対 照 法
1	49.8	60.8
2	121.0	120.7
3	144.8	144.8
4	85.9	88.9
5	70.3	60.8
6	93.1	81.1
7	105.5	92.1
8	116.0	103.1
9	130.0	108.2
10	129.7	116.2
11	139.2	126.5
12	154.3	138.7
13	160.9	151.3
14	189.7	173.0
15	243.5	236.9
16	77.5	79.3
17	165.5	173.9
18	168.3	170.3
19	121.6	118.2
20	93.6	87.3
21	99.0	92.7
22	70.7	63.8
23	175.7	164.0
24	112.2	99.3

#### 産業上の利用の可能性

本発明によれば、生体試料成分中の物質、例えば血清中の特定画分 (リポ蛋白質など) 中の物質 (コレステロールなど) を他の画分より分離することなく分析することができる。したがって、遠心分画などの分離分画が不要であるから、操作が簡便であり、測定誤差や人為的要因での問題を低減させることができる。

また、二種類の試薬を用いる方法に応用できるので、汎用型の自動分析装置を用いた連続的な測定が可能となり、他の検査項目とマルチチャンネル化して測定することができる。

本出願は日本で出願された平成9年特許願第169281号を基礎としており、それらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

## 請求の範囲

1. カリクスアレン類が生体試料成分と複合体を形成することを特徴とするカリクスアレン類を含有する試薬。

2. 生体試料成分が、高比重リポ蛋白質、低比重リポ蛋白質、超低比重リポ蛋白質またはレムナント様リポ蛋白質である請求の範囲1に記載の試薬。

3. カリクスアレン類が、カリクス(4)アレン、カリクス(6)アレン、カリクス(8)アレン、硫酸カリクス(4)アレン、硫酸カリクス(6)アレン、硫酸カリクス(8)アレン、酢酸カリクス(4)アレン、酢酸カリクス(6)アレン、酢酸カリクス(8)アレン、カルボキシカリクス(4)アレン、カルボキシカリクス(6)アレン、カルボキシカリクス(8)アレン、カリクス(4)アレンアミン、カリクス(6)アレンアミン及びカリクス(8)アレンアミンからなる群から選ばれる少なくとも一種または二種以上である請求の範囲1に記載の試薬。

4. カリクスアレン類を含有する生体試料成分中の物質の分析用試薬。

5. 生体試料成分が、高比重リポ蛋白質、低比重リポ蛋白質、超低比重リポ蛋白質またはレムナント様リポ蛋白質である請求の範囲4に記載の試薬。

6. カリクスアレン類が、カリクス(4)アレン、カリクス(6)アレン、カリクス(8)アレン、硫酸カリクス(4)アレン、硫酸カリクス(6)アレン、硫酸カリクス(8)アレン、酢酸カリクス(4)アレン、酢酸カリクス(6)アレン、酢酸カリクス(8)アレン、カルボキシカリクス(4)アレン、カルボキシカリクス(6)アレン、カルボキシカリクス(8)アレン、カリクス(4)アレンアミン、カリクス(6)アレンアミン及びカリクス(8)アレンアミンからなる群から選ばれる少なくとも一種または二種以上である請求の範囲4に記載の試薬。

7. 生体試料成分中の物質と反応する酵素を含有する請求の範囲4に記載の試薬。

8. 酵素が、リポプロテインリパーゼ、コレステロールエステラーゼ、コレス



テロール脱水素酵素及びコレステロールオキシダーゼからなる群から選ばれる少なくとも一種または二種以上である請求の範囲 7 に記載の試薬。

9. カリクスアレン類を用いて生体試料成分中の物質を分析する方法。

10. 分析対象外の生体試料成分とカリクスアレン類との複合体を形成させることを特徴とする請求の範囲 9 に記載の方法。

11. 生体試料成分中の物質を、酵素反応により分析することを特徴とする請求の範囲 9 に記載の方法。

12. 生体試料成分が、高比重リポ蛋白質、低比重リポ蛋白質、超低比重リポ蛋白質またはレムナント様リポ蛋白質である請求の範囲 9 に記載の方法。

13. 生体試料成分中の物質が、コレステロール、中性脂質またはリン脂質である請求の範囲 12 に記載の方法。

14. カリクスアレン類が、カリクス(4)アレン、カリクス(6)アレン、カリクス(8)アレン、硫酸カリクス(4)アレン、硫酸カリクス(6)アレン、硫酸カリクス(8)アレン、酢酸カリクス(4)アレン、酢酸カリクス(6)アレン、酢酸カリクス(8)アレン、カルボキシカリクス(4)アレン、カルボキシカリクス(6)アレン、カルボキシカリクス(8)アレン、カリクス(4)アレンアミン、カリクス(6)アレンアミン及びカリクス(8)アレンアミンからなる群から選ばれる少なくとも一種または二種以上である請求の範囲 9 に記載の方法。

15. 反応液中のカリクスアレン類の濃度が  $0.05 \sim 20 \text{ mmol/l}$  である請求の範囲 9 に記載の方法。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02795

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12Q1/60, G01N33/536, G01N33/92

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12Q1/60, G01N33/536, G01N33/92

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), MEDOLINE (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 8-131197, A (Kyowa Medex Co., Ltd.), 28 May, 1996 (28. 05. 96) & WO, 9524502, A & EP, 699767, A & US, 5691159, A	1-15
A	JP, 6-242110, A (International Reagents Corp.), 2 September, 1994 (02. 09. 94) (Family: none)	1-15
A	JP, 8-503937, A (Commissariat a L'Energie Atomique), 30 April, 1996 (30. 04. 96) & WO, 9412502, A & FR, 2698362, A & EP, 670840, A & US, 5607591, A	1-15
A	JP, 1-503596, A (The Flinders University of South Australia), 7 December, 1989 (07. 12. 89), Claim 17 & WO, 8808137, A & EP, 286039, A & AU, 8815788, A	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

 Date of the actual completion of the international search  
 21 September, 1998 (21. 09. 98)

 Date of mailing of the international search report  
 29 September, 1998 (29. 09. 98)

 Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02795

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US, 5409959, A (Genelabs Incorporated), 25 April, 1995 (25. 04. 95) & WO, 9403165, A	1-15

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>8</sup> C12Q1/60, G01N33/536, G01N33/92

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>8</sup> C12Q1/60, G01N33/536, G01N33/92

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)

MEDOLINE (DIALOG)

WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 8-131197, A (協和メデックス株式会社) 28.5月. 1996 (28.05.96) & WO, 9524502, A & EP, 699767, A & US, 5691159, A	1-15
A	JP, 6-242110, A (国際試薬株式会社) 2.9月. 1994 (02.09.94) (ファミリーなし)	1-15
A	JP, 8-503937, A (コミッサレ・ア・レナジイ ・アトミック) 30.4月. 1996 (30.04.96) & WO, 9412502, A & FR, 2698362, A & EP, 670840, A & US, 5607591, A	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.09.98

国際調査報告の発送日

29.09.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

塚中哲雄

4B

7731

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 1-503596, A (ザ フリンダーズ ユニヴァーシティ オブ サウス オーストラリア) 7.12月.1989 (07.12.89), 請求の 範囲第17項&WO, 8808137, A&EP, 286039, A& AU, 8815788, A	1-15
A	US, 5409959, A (Genelabs Incorporated) 25.4月.1995 (25.04.95) &WO, 9403165, A	1-15